

腸管上皮細胞株（CaCo-2）におけるミセル化コレステロールのエステル化及びその分泌

著者	小中 一典
発行年	1995-03-23
URL	http://hdl.handle.net/10422/2131

氏 名・(本籍)	小 中 一 典 (兵庫県)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士第186号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位論文題目	腸管上皮細胞株 (CaCo-2) におけるミセル化コレステロールのエステル化及びその分泌

審 査 委 員	主査 教授	大久保 岩 男
	副査 教授	馬 場 忠 雄
	副査 教授	繁 田 幸 男

論 文 内 容 要 旨

[目 的]

糖尿病における高コレステロール血症の原因のひとつとして、食事性コレステロール吸収の亢進が挙げられる。糖尿病状態ではコレステロールのエステル化を担うアシルCoA:コレステロールアシルトランスフェラーゼ (ACAT) の酵素活性が腸管上皮細胞内で上昇していることが、コレステロール吸収増加の一因とされているが、この活性上昇とコレステロール吸収増加を直接結びつけた実験成績はない。申請者は、in vitro実験系でコレステロール吸収の調節機構を検討するために、ACAT活性上昇物質である25-OHコレステロール、エステル化の際に良い基質となるオレイン酸、及び糖尿病に深く関与するホルモンであるインスリンのミセル化されたコレステロールのエステル化及びその分泌への影響を、小腸上皮細胞様に分化するとされる大腸癌細胞CaCo-2を用いて観察した。

[方 法]

Membrane filter上で培養しconfluency到達後14-15日経たCaCo-2細胞を、ヒト合成インスリン (5 μ g/ml)、オレイン酸 (500 μ M) -ウシ血清アルブミン (160 μ M) 複合体、25-OHコレステロール (10 μ g/ml) 等を含む培養液で24時間前処置した後、タウロコール酸 (1 mM) 及び卵黄ホスファチジルコリン (200 μ M) でミセル化したコレステロール ($[^{14}\text{C}]$ コレステロールをtracerとして含む) を上層の培養液に加え、48時間孵置した。インスリンは下層の培養液に、これ以外は上層の培養液に添加した。孵置後、細胞層及び下層の培養液からヘキサソーイソプロパノール (3:2, v/v) を用いて脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーでコレステロールエステルを分離してその放射活性を測定した。

[結 果]

オレイン酸の非存在下では、25-OHコレステロール添加により細胞内コレステロールのエステル化は $301 \pm 16 \text{ pmol/well/48時間}$ (対照群 $61.3 \pm 2.6 \text{ pmol/well/48時間}$) と約5倍増加していたが、下層培養液への分泌は $26.1 \pm 1.5 \text{ pmol/well/48時間}$ (対照群 $26.5 \pm 0.5 \text{ pmol/well/48時間}$) と変化しなかった。この時インスリンを添加すると、細胞内でのエステル化が $301 \pm 1.3 \text{ pmol/well/48時間}$ と増加しているにもかかわらず、下層培養液への分泌は $19.5 \pm 0.5 \text{ pmol/well/48時間}$ と対照実験より減少した。

オレイン酸500 μ M存在下では、25-OHコレステロール添加により細胞内コレステロールのエステル化は $1770 \pm 21 \text{ pmol/well/48時間}$ (対照群 $561 \pm 8 \text{ pmol/well/48時間}$) と約3倍増加し、下層培養液

への分泌も $78.9 \pm 2.6 \text{ pmol/well/48時間}$ (対照群 $39.1 \pm 2.1 \text{ pmol/well/48時間}$)と増加した。この時インスリンを添加すると、下層培養液への分泌は $45.5 \pm 3.4 \text{ pmol/well/48時間}$ と減少し、対照実験と差を認めなかった。

インスリンを単独で添加した場合、細胞内でのエステル化及びその分泌は、そのいずれもが濃度依存性に抑制され、50%抑制に必要なインスリンの濃度は約 $5-10 \text{ ng/ml}$ であり、生理学的濃度に近い値であった。

[考 察]

CaCo-2細胞においては、ACAT活性が亢進して細胞内コレステロールエステル合成が増加しても、その分泌は必ずしも増加せず、オレイン酸の細胞への流入と併せてはじめて分泌が増加した。インスリンはこの分泌を低下させたが、この作用は細胞内コレステロールエステル合成の増加した条件でも観察された。したがって腸管上皮でのコレステロール吸収機構には、コレステロールのエステル化以外にも、オレイン酸及びイスリンで調節を受ける段階があることが示唆される。この候補としては、腸管上皮細胞内で行われるアポ蛋白B及びトリグリセリド (TG) の合成・リポ蛋白への組み込み、そして分泌顆粒の輸送といった過程が挙げられる。アポ蛋白Bの分泌がオレイン酸により増加し、インスリンにより抑制させることは、CaCo-2細胞において報告されており、本実験における結果はアポ蛋白Bのリポ蛋白への組み込みという段階の調節を介している可能性がある。また最近、脂質吸収異常を呈する無 β -リポ蛋白血症においてMicrosomal TG Transfer Proteinの遺伝子異常がみられることや、肝癌細胞HepG2においてTG合成を阻害すると、オレイン酸によるアポ蛋白Bの分泌増加が抑制されることが報告されており、TGの合成・リポ蛋白への組み込みがリポ蛋白分泌に調節に関与している可能性が想定されている。糖尿病におけるインスリン作用不足にともなうコレステロール吸収亢進は、本研究で示されたようにACAT活性亢進のみでなく、これらの機序の総合的異常によると考えられる。

[結 論]

腸管上皮でのコレステロール吸収は、コレステロールのエステル化以外の段階でもインスリンによる調節を受けている。糖尿病におけるコレステロールの吸収亢進には、インスリン作用の不足によるこれらの機構の異常が寄与すると思われる。

学位論文審査の結果の要旨

本研究は、糖尿病に合併する高コレステロール血症の原因の一つとされる腸管でのコレステロール吸収亢進の機序を解明するために、分化型大腸癌細胞株 (CaCo-2) を膜フィルター上に培養し、十分分化した条件にて、ミセル化したコレステロールの取り込み・エステル化・分泌を検討したものである。検討するにあたってインスリンfoオレイン酸、25-OH Cholesterol (Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase 活性増強剤) を使用した。

得られた結果は以下の通りである。

- 1) 細胞内でコレステロールのエステル化が亢進しても、コレステロールの分泌はエステル型も含め増加しなかった。
- 2) オレイン酸存在下では、細胞内でコレステロールのエステル化が亢進すると、コレステロールの分泌はエステル型も含め増加した。
- 3) インスリンは、細胞内でのコレステロールのエステル化亢進とは無関係に、コレステロールの分泌

をエステル型も含め抑制した。

- 4) インスリンは、濃度依存的にコレステロールの分泌をエステル型も含め抑制した。その50% Effective Dose は約10ng/mlであった。

以上より、CaCo-2細胞のコレステロール分泌は、細胞内でのエステル化以降の段階においても調節され、インスリンはこうした段階においても調節因子であることが示された。従って、糖尿病における食事性コレステロール吸収増加には、小腸上皮内でのコレステロールエステルのリポ蛋白への組み込みやリポ蛋白の細胞内輸送・リンパへの放出といった過程におけるインスリン作用の低下が関与していることが示唆された。

本研究は、コレステロール吸収の調節機構の一部を明らかにしたものとして興味深いものであり、博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。